·论著·

Klotho 在盐敏感性高血压肾损伤中的作用及分子机制研究

赵伟[1，2]，唐荣杰[1，2]，杨珊珊[1，2]，杨芳[1]，孙锋[1]，廉秋芳[1，2*]

【摘要】 **背景** Klotho 与肾脏疾病的发生、发展密切相关，盐敏感性高血压（SSH）常伴随肾脏疾病的发生。目前 klotho 在 SSH 肾损伤中的作用及分子机制研究鲜见报道。**目的** 探讨 klotho 在 SSH 肾损伤中的作用及分子机制。**方法** 于 2021-06-15 选取大鼠肾小球系膜细胞株 HBZY1 为实验细胞，将实验细胞分为对照组与造模组，采用 NaCl 137 mmol/L 和血管紧张素Ⅱ（AngⅡ）10^{-6} mmol/L 共同诱导的 HBZY1 细胞损伤模型模拟 SSH 肾损伤，收集细胞。实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）与蛋白质印记法（Western Blot）检测 klotho mRNA 和蛋白表达的差异。构建 klotho 干扰载体和过表达载体与血管紧张素Ⅱ 1 型受体（AT1R）过表达载体，klotho 干扰实验分为五组，包括对照组、空载组、klotho-siRNA1、klotho-siRNA2、klotho-siRNA3；klotho 过表达实验分为三组，包括对照组、空载组、klotho 过表达组；AT1R 过表达实验分为三组，包括对照组、空载组、AT1R 过表达组。将构建的载体转染至细胞中并验证转染效率。转染成功后将实验分两部分进行，第一部分实验验证 klotho 的肾脏保护作用，实验分组为四组，包括对照组、造模组、klotho 过表达组与 klotho 干扰组，第二部分实验探索 klotho 的肾脏保护作用是否与 AT1R 相关，实验分为三组，包括造模组、klotho 过表达组、klotho+AT1R 过表达组。转染成功后进行下列检测，细胞计数试剂 8（CCK-8）法检测细胞活力，流式细胞术检测细胞活性氧（ROS）含量，酶联免疫吸附测定（ELISA）法检测细胞上清液中丙二醛（MDA）与超氧化物歧化酶（SOD）含量，免疫共沉淀（Co-IP）检测 klotho 与 AT1R 相互作用的影响。**结果** 与对照组相比，造模组中 klotho 的 mRNA 水平与蛋白表达均下降（t=7.102、7.506，P=0.002、0.002）。与对照组相比，klotho-siRNA2 干扰效果显著（P<0.001）；klotho 过表达组的 klotho 蛋白表达明显升高（P<0.001）；AT1R 过表达组的 AT1R 蛋白表达明显升高（P<0.001）。klotho 对细胞活力及氧化应激损伤的影响：与对照组相比，造模组细胞活力下降（P<0.001），细胞内 ROS、MDA 含量升高（P<0.001、P=0.004），细胞内 SOD 含量下降（P=0.041）；与造模组相比，klotho 过表达组细胞活力升高（P<0.001），细胞内 ROS、MDA 含量下降（P<0.001、P=0.003），细胞内 SOD 含量上升（P=0.018）；与造模组相比，klotho 干扰组细胞活力下降（P<0.001），细胞内 ROS、MDA 含量升高（P<0.001、P=0.002），细胞内 SOD 含量下降（P=0.001）。klotho 通过 AT1R 对细胞活力及氧化应激损伤的影响：与造模组相比，klotho 过表达组细胞活力升高（P<0.001），细胞内 ROS、MDA 含量下降（P<0.001、P=0.024），细胞内 SOD 含量上升（P=0.007）；与 klotho 过表达组相比，klotho+AT1R 过表达组细胞活力下降（P<0.001），klotho+AT1R 过表达组细胞内 ROS、MDA 含量上升（P<0.001、P=0.001），细胞内 SOD 含量下降（P=0.002）。Co-IP 确定 klotho 与 AT1R 之间存在交互作用。**结论** klotho 通过与 AT1R 相互作用，抑制氧化应激损伤，从而在 SSH 肾损伤中发挥保护作用。

【关键词】 高血压；盐敏感性高血压；肾损伤；氧化应激；klotho；血管紧张素Ⅱ；受体，血管紧张素，1 型

【中图分类号】 R 544.1 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0010

赵伟，唐荣杰，杨珊珊，等 . Klotho 在盐敏感性高血压肾损伤中的作用及分子机制研究［J］. 中国全科医学，2023.

ZHAO W，TANG R J，YANG S S，et al. The role and molecules mechanism of klotho in renal injury in salt-sensitive hypertension［J］. Chinese General Practice，2023.

The Role and Molecules Mechanism of Klotho in Renal Injury in Salt-sensitive Hypertension

ZHAO Wei[1，2]，TANG Rongjie[1，2]，YANG Shanshan[1，2]，YANG Fang[1]，SUN Feng[1]，LIAN Qiufang[1，2]*

1.Department of Cardiology，Xianyang Hospital of Yan'an University，Xianyang 712000，China

2.Medical School of Yan'an University，Yan'an 716000，China

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82160090）；陕西省重点研发计划项目（2021SF-396）；陕西省中医药科研项目（2021-ZZ-JC042）

1.712000 陕西省咸阳市，延安大学咸阳医院心血管内科 2.716000 陕西省延安市，延安大学医学院

*通信作者：廉秋芳，副教授；E-mail：wjylqf@163.com

*Corresponding author: LIAN Qiufang, Associate professor; E-mail: wjylqf@163.com

【Abstract】 **Background** Klotho is closely related to the occurrence and development of kidney disease. Salt-sensitive hypertension (SSH) is often accompanied by kidney disease. At present, there are few reports on the role and molecules mechanism of klotho in renal injury in SSH. **Objective** To investigate the role and molecules mechanism of klotho in renal injury in SSH. **Methods** The rat glomerular mesangial cell line HBZY1 was selected as the experimental cells on June 15, 2021, and the experimental cells were divided into the control group and the model group. The model of HBZY1 cell injury induced by NaCl 137 mmol/L and angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) 10^{-6} mmol/L was used to simulate the renal injury in SSH, and the cells were collected. The differences in the expression of klotho mRNA and protein were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and Western Blot. The interference vector and overexpression vector of klotho and the overexpression vector of angiotensin Ⅱ type 1 receptor (AT1R) were constructed. The klotho interference experiments were divided into five groups, including the control group, empty group, klotho-siRNA1 group, klotho-siRNA2 group and klotho-siRNA3 group; The klotho overexpression experiments were divided into three groups, including the control group, empty group and klotho overexpression group; The AT1R overexpression experiments were divided into three groups, including the control group, empty group and AT1R overexpression group. The constructed vectors were transfected into cells with verified transfection efficiency. After successful transfection, the experiment was divided into two parts. The first part of the experiment was to verify the renal protective effect of klotho, the experiment subjects were divided into four groups, including the control group, model group, klotho overexpression group and klotho interference group. The second part of the experiment was to explore whether the renal protective effect of klotho was related to AT1R, the experiment subjects were divided into three groups, including the model group, klotho overexpression group and klotho+AT1R overexpression group. After successful transfection, the tests including cell viability detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method, reactive oxygen species (ROS) content detected by flow cytometry, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) content in cell supernatant detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), interaction effect between kltho and AT1R detected by co-immunoprecipitation (Co-IP). **Results** Compared with the control group, mRNA level and protein expression of klotho in the model group decreased in model group (t=7.102, 7.506; P=0.002, 0.002), klotho-siRNA2 interference effect was more significant (P<0.001), the expression of klotho protein in the klotho overexpression group increased significantly (P<0.001), the expression of AT1R protein in the overexpression group increased significantly (P<0.001). Effects of klotho on cell viability and oxidative stress injury: Compared with the control group, cell viability in the model group decreased (P<0.001), intracellular ROS and MDA content increased (P<0.001, P=0.004), and SOD content decreased (P=0.041); Compared with the model group, cell viability in the klotho overexpression group increased (P<0.001), intracellular ROS and MDA content decreased and SOD content increased (P<0.001, P=0.003, P=0.018); Compared with the model group, cell viability in the klotho interference group decreased (P<0.001), while intracellular ROS and MDA content increased and SOD content decreased (P<0.001, P=0.002, P=0.001). Effects of klotho on cell viability and oxidative stress injury through AT1R: Compared with the model group, cell viability increased (P<0.001), intracellular ROS and MDA content decreased and SOD content increased (P<0.001, P=0.024, P=0.007) in the klotho overexpression group; Compared with the klotho overexpression group, cell viability decreased (P<0.001), ROS and MDA content increased and SOD content decreased (P<0.001, P=0.001, P=0.002) in the klotho+AT1R overexpression group. Co-IP determined that there was an interaction between klotho and AT1R. **Conclusion** Klotho plays a protective role in renal injury in SSH by inhibiting oxidative stress injury through interaction with AT1R.

【Key words】 Hypertension; Salt-sensitive hypertension; Kidney injury; Oxidative Stress; Klotho; Angiotensin Ⅱ; Receptor, angiotensin, type 1

盐为高血压的重要易患因素，血压的盐敏感性是指在高盐摄入时血压呈现的一种升高反应，与此相关联的高血压类型称为盐敏感性高血压（salt-sensitive hypertension，SSH）[1]。调查显示，51%的高血压人群具有盐敏感性，并且SSH占我国高血压人群的50%~60%[2]。此外，相较于原发性高血压，SSH患者血管、心脏、肾脏等靶器官损伤的发生率更高，损伤程度更严重[3]。其中，SSH肾损伤是长期高盐负荷与血压控制不佳所致的共同结局，会迁延发展至慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD），甚至为终末期肾病。Klotho作为一种抗衰老基因[4]，主要在肾脏中表达，其编码的分泌型蛋白（klotho蛋白）可以激素样形式进入血液循环中发挥积极效应。研究发现，任何形式的肾损伤都会导致klotho表达下降，klotho缺乏出现于CKD的任意阶段，同时也会加速CKD的进展[5]。目前，klotho已作为一种评估CKD患者病情及预后的新型

标志物，并在 CKD 治疗中发挥重要作用[6-7]。然而，迄今为止，klotho 在 SSH 肾损伤中的作用及分子机制研究鲜见报道。因此，本实验采用 NaCl 137 mmol/L 和血管紧张素Ⅱ（Angiotensin Ⅱ，Ang Ⅱ）10^{-6} mmol/L 共同诱导的 HBZY1 细胞损伤模型模拟 SSH 肾损伤，通过观察 klotho 对 HBZY1 细胞活性及相关指标的影响，阐明 klotho 在 SSH 肾损伤中的作用及分子机制，对高血压的管理和心血管疾病的预防意义重大。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 大鼠肾小球系膜细胞株 HBZY1（Procell，货号：CL-0092）。

1.1.2 实验试剂 实验所用主要试剂包括：Opti-MEM®，TRIzol Reagent（康为世纪，货号：CW0580S）；Ultrapure RNA 超纯 RNA 提取试剂盒（康为世纪，货号：CW0581M）；HiScript Ⅱ Q RT SuperMix for qPCR（+gDNA wiper）（Vazyme，货号：R223-01）；2×SYBR Green PCR Master Mix（Lifeint，货号：A4004M）；Reactive Oxygen Species Assay Kit（凯基生物，货号：KGT010-1100assays）；超氧化物歧化酶（SOD）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（酶免，货号：MM-0386R2）；丙二醛（MDA）试剂盒（酶免，货号：MM-0385R2）；超敏发光液（赛默飞，货号：RJ239676）；PVDF 膜（Millipore，货号：IPVH00010）；内参一抗：Mouse Monoclonal Anti-GAPDH（中杉金桥，货号：TA-08，1/2000）；二抗：辣根酶标记山羊抗鼠 IgG（H+L）（中杉金桥，货号：ZB-2305）；目的一抗：Rabbit Anti klotho（Santa Cruz，货号：sc-515942，1/1000）；目的一抗：Rabbit Anti AT1R（Proteintech，货号：25343-1-AP，1/1000）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（MDL，货号：MD913053）；聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）预制胶套装试剂盒（MDL，货号：MD911919）；RNase Free ddH20（湖南艾特捷生物科技有限公司，货号：RO1012）；β-actin（Affinity，货号：AF7018）；辣根过氧化物酶（HRP）（北京索莱宝科技有限公司，货号：P8020）；磷酸缓冲盐溶液（PBS）（BioVision，货号：2128-1000）；lipofectamine 3000（赛默飞，货号：L3000015）；P3000（Qiagen，货号：9013150）；RIPA 裂解缓冲液（北京普利莱基因技术有限公司，货号：C1055）。

1.1.3 实验仪器 荧光 PCR 仪〔伯乐生命医学产品（上海）有限公司，货号：CFX Connect ™实时〕；超高灵敏度化学发光成像系统（伯乐生命医学产品（上海）有限公司，货号：Chemi DocTM XRS+）；全自动化学发光图像分析系统（上海天能科技有限公司，货号：Tanon-5200）；NovoCyte ™流式细胞仪〔艾森生物（杭州）有限公司，货号：NovoCyte2060R〕；全自动酶标仪（六一，货号：WD-2102B）。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞造模及分组 实验开始于 2021-06-15，首先，将实验细胞分为对照组与造模组，其中对照组正常培养，造模组给予 NaCl 137 mmol/L 和 Ang Ⅱ 10^{-6} mmol/L 刺激 24 h 建立 SSH 肾损伤细胞模型，收集细胞，实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）与蛋白质印记法（Western Blot）检测 klotho mRNA 和蛋白表达的差异。其次，为了验证 klotho 的肾脏保护作用及其相关机制，构建 klotho 干扰载体和过表达载体与血管紧张素Ⅱ 1 型受体（AT1R）过表达载体。klotho 干扰实验分为五组，包括对照组、空载组、klotho-siRNA1、klotho-siRNA2、klotho-siRNA3，其中，空载组转染空白质粒，klotho-siRNA1、klotho-siRNA2、klotho-siRNA3 三组分别转染含有相应序列的 siRNA 质粒载体；klotho 过表达实验分为三组，包括对照组、空载组、klotho 过表达组，其中，空载组转染空白质粒载体，klotho 过表达组转染含有 klotho 基因的重组质粒；AT1R 过表达实验分为三组，包括对照组、空载组、AT1R 过表达组，其中，空载组转染空白质粒载体，AT1R 过表达组转染含有 AT1R 基因的重组质粒。将构建的载体转染至细胞中并验证转染效率。转染成功后将实验分两部分进行，第一部分实验验证 klotho 的肾脏保护作用，实验分组为四组，包括对照组、造模组、klotho 过表达组与 klotho 干扰组，第二部分实验探索 klotho 的肾脏保护作用是否与 AT1R 相关，实验分为三组，包括造模组、klotho 过表达组、klotho+AT1R 过表达组。采用细胞计数试剂 8（CCK-8）法检测细胞活力，流式细胞术检测细胞活性氧（ROS）含量，ELISA 法检测细胞上清液中 MDA 与 SOD 含量，免疫共沉淀（Co-IP）检测 klotho 与 AT1R 相互作用的影响。

1.2.2 细胞转染 当细胞密度为 70% 时，更换培养基；取 2 个灭菌 EP 管，每管加 125 μl Opti-MEM®，其中一管加入 5 μl lipofectamine 3000，另一管加入 2.5 μg 质粒、5 μl P3000，混匀后室温孵育 5 min；将上述两个 EP 管混匀，室温孵育 15 min，将混合液滴到六孔板中对应的孔内，将细胞放回孵箱培养；转染 4 h 后在六孔板中加入血清含量为 20% 的完全培养基 1 ml；48 h 后进行后续处理。

1.2.3 CCK-8 法 将转染后的细胞消化、重悬，计数，铺板，细胞密度为 7 000 个 / 孔；待细胞贴壁后，24 h 后将待测的 96 孔板细胞换成相同的培养基，每孔 100 μl；每孔加入 10 μl CCK-8 试剂，置于培养箱中孵育 2 h；酶标仪在 450 nm 波长处检测每孔的吸光度（OD）值。

1.2.4 流式细胞术 按照1:1 000用无血清培养基稀释活性氧荧光探针（DCFH-DA），最终浓度为10 μmol/L；弃去细胞培养液，向细胞中加入稀释后的DCFH-DA，37℃培养箱孵育20 min；用无血清的培养液洗涤3次，以充分去除多余的未进入细胞的DCFH-DA；加1 ml PBS洗涤，1 500 rpm离心5 min，弃上清液；加300 μl PBS重悬细胞后上机。

1.2.5 ELISA法 从室温平衡60 min后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回4℃。设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品50 μl；样本孔中加入待测样本50 μl；空白孔不加。标准品孔和样本孔中每孔加入HRP标记的检测抗体100 μl，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育60 min。弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（350 μl），静置1 min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板5次。每孔加入底物A、B各50 μl，37℃避光孵育15 min。每孔加入终止液50 μl，15 min内，在450 nm波长处测定各孔的OD值。

1.2.6 qRT-PCR TRIzol使样本充分裂解，提取RNA进行浓度、纯度测定，将RNA通过逆转录HiFiScript cDNA第一链合成试剂盒合成cDNA，以cDNA为模板，在荧光定量PCR仪上进行检测，以β-actin为内参，计算出各组细胞中mRNA的相对表达水平。其中反应体系包括：2×SYBR Green PCR Master Mix（10 μl）、cDNA（1 μl）、上游引物（0.4 μl）、下游引物（0.4 μl）、RNase Free ddH20（8.2 μl）。klotho引物上游5′-ACTTTCTTCTGCCCTATTTCACG-3′、下游5′-CCAGGTAATCGTTGTATTTTATCGG-3′，β-actin引物上游5′-GCCATGTACGTAGCCATCCA-3′、下游5′-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3′。

1.2.7 Western Blot 细胞加入裂解液，冰上放置15 min，12 000 r/min高速离心机离心10 min，取上清液，加入缓冲溶液，煮沸5 min，-20℃保存。用BCA蛋白质定量试剂盒检测细胞上清液中蛋白浓度，绘制标准曲线。制作SDS-PAGE胶，上样，开始跑胶，电泳60 V压缩蛋白，80 V分离蛋白（120 min），切好含有内参或目的条带的胶。依次放好海绵、滤纸、胶、膜、滤纸、海绵。用预冷的1×转膜液浸没目的胶带复合物，用300 mA恒流转膜。用1×TBST配置3%的脱脂牛奶封闭液，封闭1 h。将PVDF膜孵育一抗过夜。洗膜，用1×TBST浸泡10 min后弃掉，重复3次。将PVDF膜孵育二抗2 h。洗膜，用1×TBST浸泡10 min后弃掉，重复3次。用发光液浸湿PVDF膜后放置于超高灵敏度化学发光成像系统样品放置区运行程序显影成像。

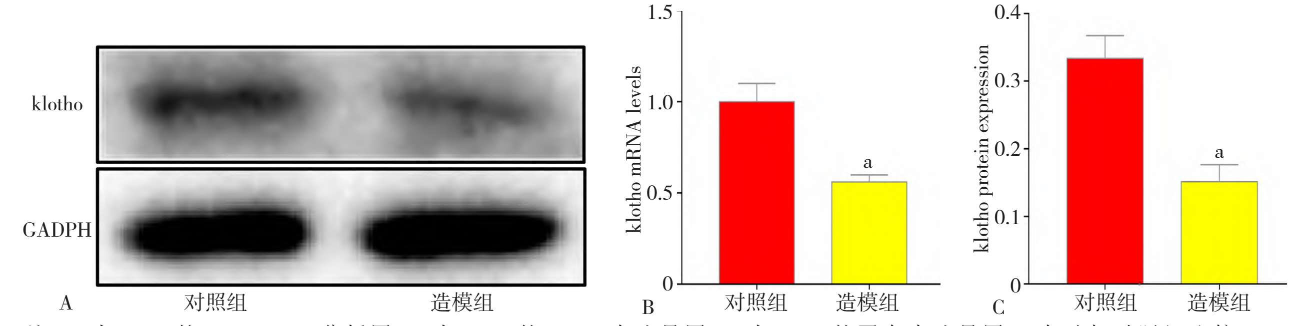
1.2.8 Co-IP RIPA裂解缓冲液裂解细胞后，BCA法测定蛋白浓度，取等量的蛋白首先用IgG和A/G蛋白交联琼脂糖胶粒预处理，然后用Klotho抗体与琼脂糖胶粒孵育，最后取等量蛋白行凝胶电泳、转膜后再用相应的抗体进行检测。

1.3 统计学方法 数据分析及实验作图均采用GraphPad Prism 8.0软件进行。各项实验至少进行3次独立平行实验，结果均以（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用独立样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用Tukey检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NaCl和Ang Ⅱ处理对HBZY1细胞中klotho mRNA和蛋白的影响 与对照组相比，造模组中klotho的mRNA水平与蛋白表达均下降，差异有统计学意义（t=7.102、7.506，P=0.002、0.002），见图1。

2.2 klotho干扰和过表达与AT1R过表达验证结果 对照组、空载组、klotho-siRNA1、klotho-siRNA2、klotho-siRNA3五组间蛋白表达比较，差异有统计学意义（F=23.13，P<0.001）；与对照组相比，三条klotho干扰序列都具有干扰效果，其中klotho-siRNA2干扰效果最好，差异有统计学意义（P<0.001），见图2。对照组、空载组、klotho过表达组三组间蛋白表达比较，差异有统计学意义（F=414.80，P<0.001）；与对照组相

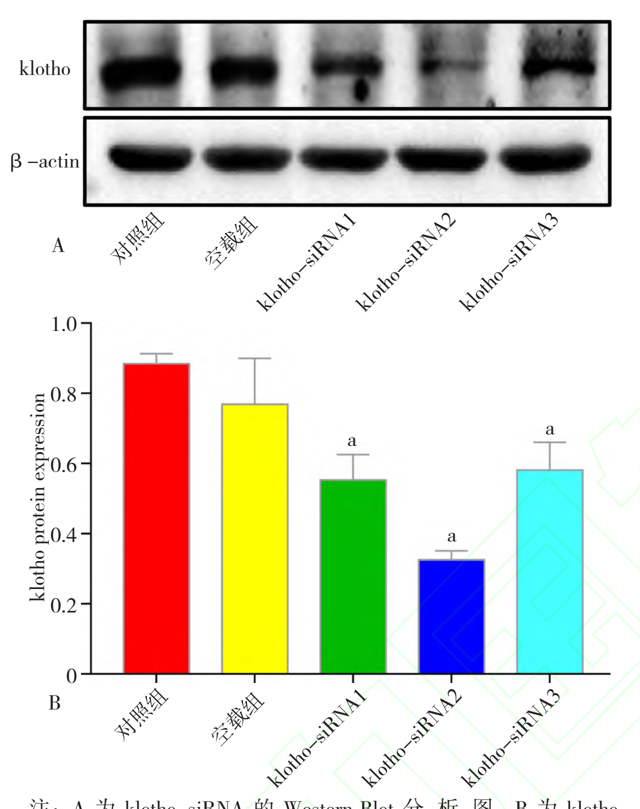


注：A为klotho的Western Blot分析图，B为klotho的mRNA表达量图，C为klotho的蛋白表达量图；[a]表示与对照组比较P<0.05；GADPH=甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图1 NaCl和Ang Ⅱ处理对HBZY1细胞中klotho mRNA和蛋白的影响

Figure 1 Effect of NaCl and Ang Ⅱ treatment on klotho mRNA and protein in HBZY1 cells

比，klotho 过表达组的 klotho 蛋白表达明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.001），见图 3。对照组、空载组、AT1R 过表达组三组间蛋白表达比较，差异有统计学意义（*F*=53.97，*P*<0.001）；与对照组相比，AT1R 过表达组的 AT1R 蛋白表达明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.001），见图 4。



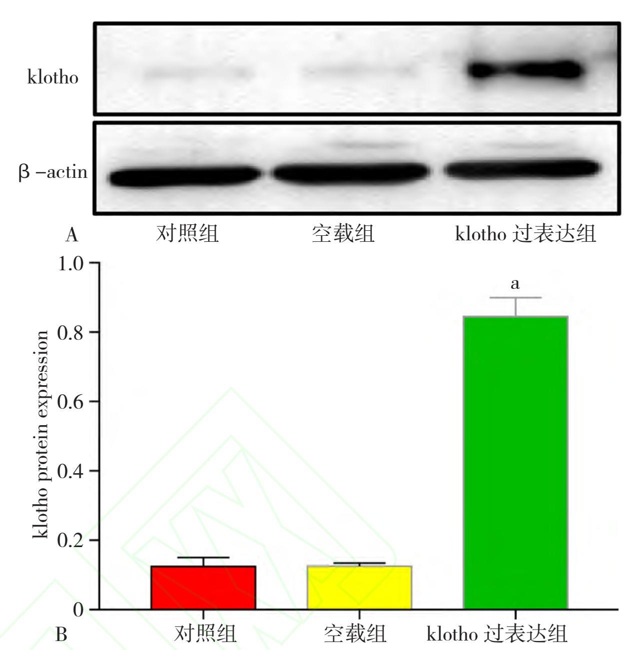
注：A 为 klotho-siRNA 的 Western Blot 分析图，B 为 klotho-siRNA 的蛋白表达量图；[a] 表示与对照组比较 *P*<0.05

图 2 klotho 干扰验证结果

Figure 2 Verification results of klotho interference

2.3 klotho 对细胞活力的影响 对照组、造模组、klotho 过表达组、klotho 干扰组四组间细胞活力比较，差异有统计学意义（*F*=537.60，*P*<0.001）；与对照组相比，造模组细胞活力下降，差异有统计学意义（*P*<0.001）；与造模组相比，klotho 过表达组细胞活力升高，klotho 干扰组细胞活力下降，差异有统计学意义（*P*<0.001），见图 5。

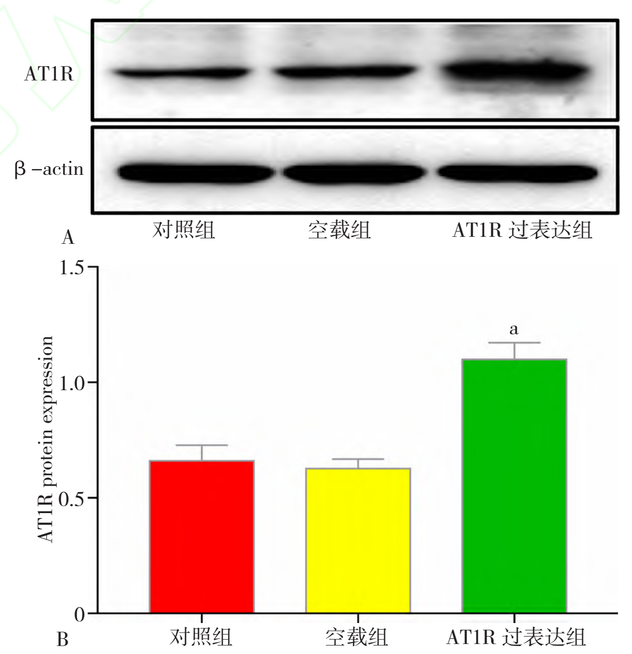
2.4 klotho 对细胞氧化应激损伤的影响 对照组、造模组、klotho 过表达组、klotho 干扰组四组间 ROS、MDA，SOD 含量比较，差异有统计学意义（*F*=1 677.00、54.33、47.15，*P*<0.001）。与对照组相比，造模组细胞内 ROS、MDA 含量升高，SOD 含量下降，差异有统计学意义（*P*<0.001、*P*=0.004、*P*=0.041）。与造模组相比，klotho 过表达组 ROS、MDA 含量下降，SOD 含量上升（*P*<0.001、*P*=0.003、*P*=0.018）；而 klotho 干扰组 ROS、MDA 含量进一步升高，SOD 含量进一步下降，差异有统计学意义（*P*<0.001、*P*=0.002、*P*=0.001），见图 6。



注：A 为 klotho 过表达的 Western Blot 分析图，B 为 klotho 过表达的蛋白表达量图；[a] 表示与对照组比较 *P*<0.05

图 3 klotho 过表达验证结果

Figure 3 Verification results of klotho overexpression



注：A 为 AT1R 过表达的 Western Blot 分析图，B 为 AT1R 过表达的蛋白表达量图；[a] 表示与对照组比较 *P*<0.05；AT1R= 血管紧张素Ⅱ-1 型受体

图 4 AT1R 过表达验证结果

Figure 4 Verification results of AT1R overexpression

2.5 klotho 通过 AT1R 对细胞活力的影响 造模组、klotho 过表达组、klotho+AT1R 过表达组三组间细胞活

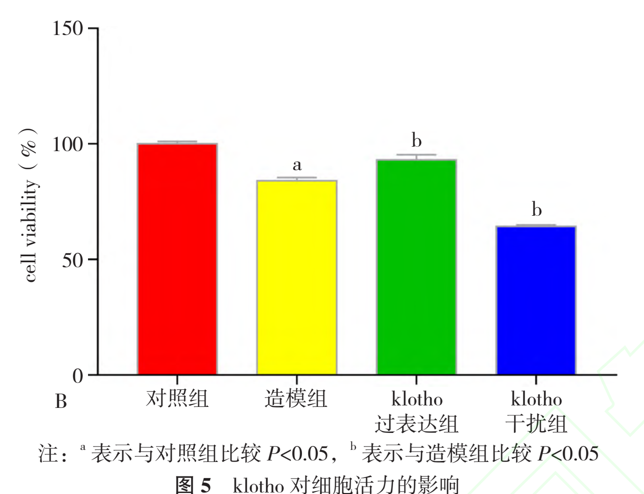
力比较，差异有统计学意义（F=335.50，P<0.001）；与造模组相比，klotho 过表达组细胞活力升高，差异有统计学意义（P<0.001）；与 klotho 过表达组相比，klotho+AT1R 过表达组细胞活力下降，差异有统计学意义（P<0.001），见图 7。

2.6 klotho 通过 AT1R 对细胞氧化应激损伤的影响 造模组、klotho 过表达组、klotho+AT1R 过表达组三组间 ROS、MDA，SOD 含量比较，差异有统计学意义（F=7 815.00、26.77、22.54，P<0.001、P=0.001、P=0.002）。与造模组相比，klotho 过表达组细胞 ROS、MDA 含量下降，SOD 含量上升，差异有统计学意义（P<0.001、P=0.024、P=0.007）。与 klotho 过表达组相比，klotho+AT1R 过表达组细胞 ROS、MDA 含量上升，SOD 含量下降，差异有统计学意义（P<0.001、P=0.001、P=0.002），图 8。

2.7 klotho 与 AT1R 相互作用 免疫共沉淀实验证明，用 klotho 抗体下拉后能检测到 AT1R 的表达，表明 klotho 和 AT1R 之间确实存在相互作用，见图 9。

3 讨论

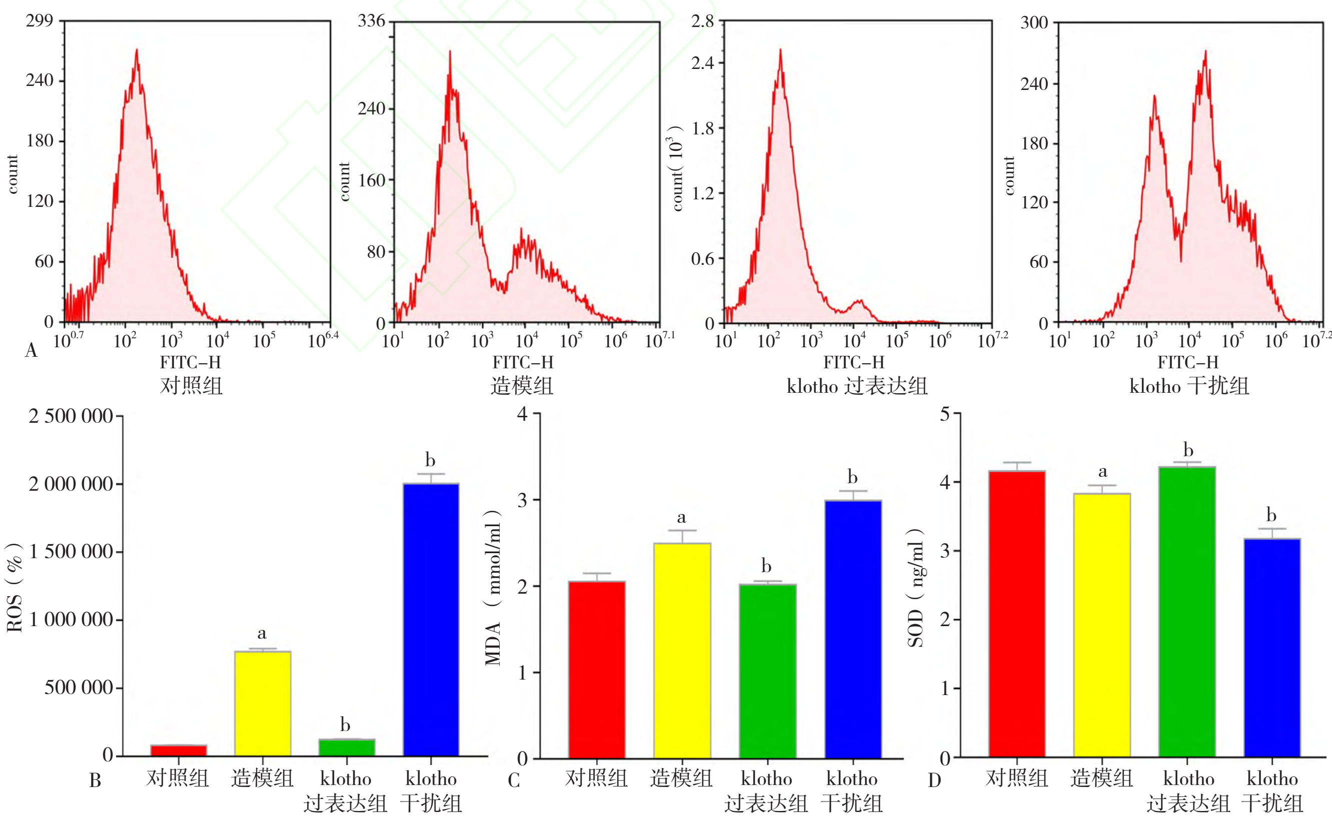
1997 年，KURO-O 等[8]通过培育基因缺陷小鼠发现了一种抑制衰老的基因——klotho 基因，该实验发现，klotho 基因的缺失会引发一系列机体衰老退化的表现，如动脉钙化、骨质疏松、皮肤皱缩、生长迟缓、步态障碍、寿命缩短等。最初的动物实验发现 klotho 主要在肾脏中表达，肾脏 Klotho 表达的消除使血液循环中 klotho 水平降低 80%，这与人体研究中所得结论一致[9]。近年来，在各种肾损伤模型的研究中，包括阿霉素肾病模型、环孢霉素 A 肾病模型、多柔比星肾病模型、糖尿病肾病模型等均发现 klotho 表达下降[10]。本研究发现，与对



注：a 表示与对照组比较 P<0.05，b 表示与造模组比较 P<0.05

图 5 klotho 对细胞活力的影响

Figure 5 Effect of klotho on cell viability



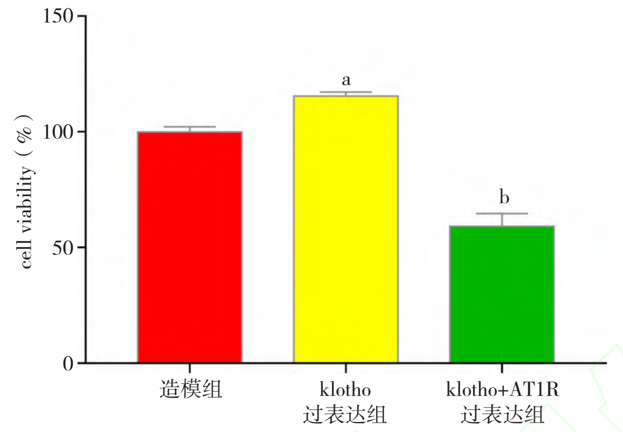
注：A 为 ROS 的流式细胞图，B 为流式细胞术测定 ROS 的表达量图，C 为 ELISA 法测定 MDA 的表达量图，D 为 ELISA 法测定 SOD 的表达量图；a 表示与对照组比较 P<0.05，b 表示与造模组比较 P<0.05；ROS= 活性氧，SOD= 超氧化物歧化酶，MDA= 丙二醛

图 6 klotho 对细胞氧化应激损伤的影响

Figure 6 Effect of klotho on oxidative stress injury of cells

照组相比，造模组 klotho mRNA 与蛋白表达均显著下降，提示在 SSH 肾损伤中存在 klotho 表达下降，这与既往研究结论一致。

Klotho 参与机体多种病理生理反应，被认为是在机体衰老进程中的重要调节因素。Klotho 基因所编码的三种 klotho 蛋白，包括 α-klotho、β-klotho、γ-klotho 蛋白都为膜结合性蛋白，其功能局限，主要是作为成纤维细胞生长因子的受体来发挥相应作用[11]。其中，

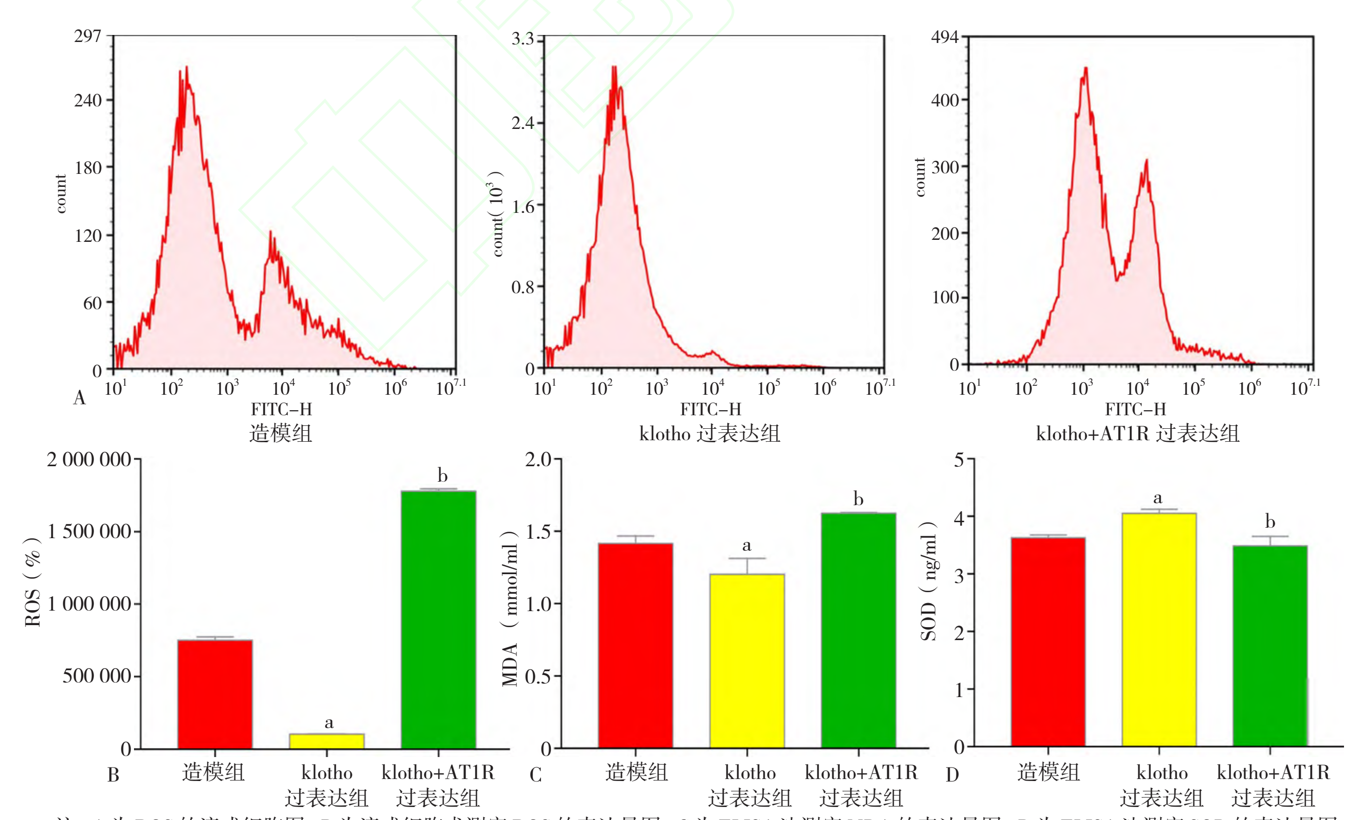


注：a 表示与造模组比较 $P<0.05$，b 表示与 klotho 过表达组比较 $P<0.05$

图 7 klotho 通过 AT1R 对细胞活力的影响

Figure 7 Effect of Klotho on cell viability via AT1R

α-klotho 蛋白可在蛋白酶的作用下将胞外结构域进行剪切，所得产物称为可溶性 klotho 蛋白[12]。研究发现，可溶性 klotho 蛋白具有抗炎、抗氧化、抗纤维化、调节钙磷代谢、调控血糖稳态等多种生物功能[13-14]。既往研究已证实 klotho 在肾损伤中的保护作用[15]。在腺嘌呤诱导的肾衰竭模型中，klotho-siRNA 治疗加剧了肾纤维化的进展，同时导致假手术组小鼠中出现肾损伤，然而，外源性补充 klotho 逆转了上述现象[16]。不仅如此，HU 等[17]发现，在肾脏缺血再灌注损伤诱导后给予 klotho 治疗可以减少 α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）与Ⅰ型胶原蛋白（Ⅰ collagen）表达，抑制肾脏纤维化，减轻肾损伤，提示即使在肾损伤发生后，klotho 同样具有治疗潜力。本研究采用 klotho-siRNA 干扰与过表达手段来探讨 klotho 对 HBZY1 细胞活力的影响。发现与对照组相比，造模组细胞活力下降。与造模组相比，klotho 过表达组细胞活力升高，而 klotho 干扰组细胞活力进一步下降，提示 klotho 对肾脏细胞具有保护作用。KIMURA 等[18]发现，过表达 klotho 的小鼠肾组织中 ROS 水平低，过氧化氢、SOD 等抗氧化酶活性高，而 klotho 缺陷小鼠 ROS 含量高，抗氧化酶活性低，表明 klotho 基因具有较强的抗氧化活性。本研究亦发现，与对照组相比，造模组细胞内 ROS、MDA 含量升高，



注：A 为 ROS 的流式细胞图，B 为流式细胞术测定 ROS 的表达量图，C 为 ELISA 法测定 MDA 的表达量图，D 为 ELISA 法测定 SOD 的表达量图；a 表示与造模组比较 $P<0.05$，b 表示与 klotho 过表达组比较 $P<0.05$

图 8 klotho 通过 AT1R 对细胞氧化应激损伤的影响

Figure 8 Effect of Klotho on oxidative stress injury of cells via AT1R

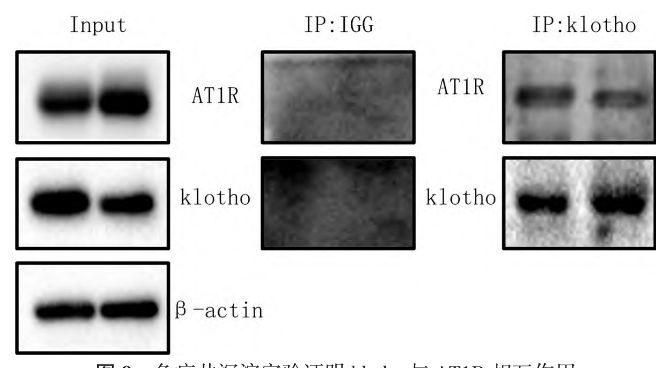


图 9 免疫共沉淀实验证明 klotho 与 AT1R 相互作用

Figure 9 Interaction between klotho and AT1R proved by co-immunoprecipitation experiment

SOD 含量下降。与造模组相比，klotho 过表达组 ROS、MDA 含量下降，SOD 含量升高，而 klotho 干扰组细胞内 ROS、MDA 含量进一步升高，SOD 活性进一步下降。提示在 HBZY1 细胞中，klotho 可通过抑制氧化应激损伤来发挥保护作用。

Ang Ⅱ是氧化应激和 ROS 介导的信号传导的有效中介，Ang Ⅱ通过激活 AT1R 诱导 ROS 的产生。在高血压小鼠心肌纤维化中，通过阻断 AT1R 可明显抑制 Ang Ⅱ诱导的心肌成纤维细胞 ROS 生成和胶原表达[19]。此外，在 Ang Ⅱ诱导的新生大鼠心肌细胞肥大的研究中，klotho 可显著抑制心肌细胞肥大，进一步研究表明，klotho 预处理显著下调 AT1R 蛋白表达，而不影响血管紧张素Ⅱ 2 型受体蛋白表达[20]。本研究中，与造模组相比，klotho 干预后 ROS、MDA 含量下降，SOD 含量升高，细胞活力升高，而 AT1R 过表达后逆转了上述现象。不仅如此，Co-IP 实验确定 klotho 与 AT1R 之间存在相互作用。提示 klotho 通过与 AT1R 受体相互作用，抑制氧化应激损伤，从而发挥细胞保护作用。

综上所述，本文从细胞水平验证了 klotho 在 SSH 肾损伤中的保护作用，并从蛋白质与蛋白质相互作用的角度，证明 klotho 通过与 AT1R 相互作用，抑制氧化应激损伤，从而发挥保护作用。后续计划在细胞实验中进一步探索 klotho 与 AT1R 之间的具体作用位点，并在动物实验中探讨 klotho 对 SSH 肾损伤的保护作用机制，为临床应用及药物研发提供更加充分的理论依据。

作者贡献：赵伟进行文章的构思与设计，结果的分析与解释及撰写论文；唐荣杰、杨珊珊进行细胞实验；杨芳负责文章的质量控制及审校；孙锋进行数据整理；廉秋芳进行论文的修订，对文章整体负责，监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] 牟建军，任珂宇．盐敏感性高血压的诊断和机制［J］．诊断学理论与实践，2012，11（6）：543-546. DOI：10.3969/j.issn.1671-2870.2012.06.002.

[2] WANG Z W，CHEN Z，ZHANG L F，et al. Status of hypertension in China：results from the China hypertension survey，2012-2015［J］. Circulation，2018，137（22）：2344-2356. DOI：10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032380.

[3] 赵营营．健脾渗湿利水方治疗盐敏感性高血压痰湿中阻证的临床研究［D］．济南：山东中医药大学，2019.

[4] XIA J K，CAO W S. Epigenetic modifications of Klotho expression in kidney diseases［J］. J Mol Med，2021，99（5）：581-592. DOI：10.1007/s00109-021-02044-8.

[5] NEYRA JA，HU MC. Potential application of klotho in human chronic kidney disease［J］. Bone，2017，100：41-49. DOI：10.1016/j.bone.2017.01.017.

[6] 杨江信，熊加川，杨可，等．血清 Klotho 水平与慢性肾脏病 3~5 期患者肾功能进展的关系［J］．第三军医大学学报，2020，42（2）：154-161. DOI：10.16016/j.1000-5404.201908129.

YANG J X，XIONG J C，YANG K，et al. Serum klotho level as an indicator for predicting the progression of renal function in chronic kidney disease stages 3-5［J］. Journal of Third Military Medical University，2020，42（2）：154-161. DOI：10.16016/j.1000-5404.201908129.

[7] FRANCO M L，BEYERSTEDT S，RANGEL É B. Klotho and mesenchymal stem cells：a review on cell and gene therapy for chronic kidney disease and acute kidney disease［J］. Pharmaceutics，2021，14（1）：11. DOI：10.3390/pharmaceutics14010011.

[8] KURO-O M，MATSUMURA Y，AIZAWA H，et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing［J］. Nature，1997，390（6655）：45-51. DOI：10.1038/36285.

[9] KAKAREKO K，RYDZEWSKA-ROSOLOWSKA A，BRZOSKO S，et al. The effect of nephrectomy on Klotho，FGF-23 and bone metabolism［J］. Int Urol Nephrol，2017，49（4）：681-688. DOI：10.1007/s11255-017-1519-9.

[10] RIK M，HANNES O，JAN-LUUK H. Effects of Klotho on fibrosis and cancer：a renal focus on mechanisms and therapeutic strategies［J］. Adv Drug Deliv Rev，2017，121：85-100. DOI：10.1016/j.addr.2017.07.009.

[11] HU M C，SHIIZAKI K，KURO-O M，et al. Fibroblast growth factor 23 and Klotho：physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism［J］. Annu Rev Physiol，2013，75：503-533. DOI：10.1146/annurev-physiol-030212-183727.

[12] LU X，HU M C. Klotho/FGF23 axis in chronic kidney disease and cardiovascular disease［J］. Kidney Dis（Basel），2017，3（1）：15-23. DOI：10.1159/000452880.

[13] 阎红伶，邱轩，陈雅洁，等．Klotho 与慢性肾脏病研究进展［J］．中国临床医生杂志，2022，50（3）：274-276. DOI：10.3969/j.issn.2095-8552.2022.03.007.

YAN H L，QIU X，CHEN Y J，et al. Research progress of Klotho and chronic kidney disease［J］. Chinese Journal for Clinicians，2022，50（3）：274-276. DOI：10.3969/j.issn.2095-8552.2022.03.007.

[14] BUCHANAN S，COMBET E，STENVINKEL P，et al. Klotho，aging，and the failing kidney［J］. Front Endocrinol：Lausanne，2020，11：560. DOI：10.3389/fendo.2020.00560.

[15] 赵颖丹，郭志勇 . Klotho 蛋白与肾脏疾病的研究进展［J］. 中国中西医结合肾病杂志，2017，18（7）：652-655.
ZHAO Y D，GUO Z Y. Research progress of Klotho protein and renal diseases［J］. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology，2017，18（7）：652-655.

[16] ZHANG Q，LIU L，LIN W J，et al. Rhein reverses Klotho repression via promoter demethylation and protects against kidney and bone injuries in mice with chronic kidney disease［J］. Kidney Int，2017，91（1）：144-156. DOI：10.1016/j.kint.2016.07.040.

[17] HU M C，SHI M，GILLINGS N，et al. Recombinant α-Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy［J］. Kidney Int，2017，91（5）：1104-1114. DOI：10.1016/j.kint.2016.10.034.

[18] KIMURA T，SHIIZAKI K，AKIMOTO T，et al. The impact of preserved Klotho gene expression on antioxidative stress activity in healthy kidney［J］. Am J Physiol Renal Physiol，2018，315（2）：F345-352. DOI：10.1152/ajprenal.00486.2017.

[19] CHEN P，YANG F，WANG W Y，et al. Liraglutide attenuates myocardial fibrosis via inhibition of AT1R-mediated ROS production in hypertensive mice［J］. J Cardiovasc Pharmacol Ther，2021，26（2）：179-188. DOI：10.1177/1074248420942007.

[20] YU L Z，MENG W，DING J Q，et al. Klotho inhibits angiotensin Ⅱ -induced cardiomyocyte hypertrophy through suppression of the AT1R/beta catenin pathway［J］. Biochem Biophys Res Commun，2016，473（2）：455-461. DOI：10.1016/j.bbrc.2016.03.029.

（收稿日期：2022-10-14；修回日期：2023-02-04）
（本文编辑：康艳辉）